

# EXPRESSÃO GÊNICA DE BAK-1 EM CMSP DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA.

**Edna Vitório de Araújo Martins<sup>1</sup>; Soraya Castro Trindade<sup>2</sup>; Isaac Suzart Gomes Filho<sup>3</sup>,  
Laerte Oliveira Barreto Neto<sup>4</sup>, Márcia Tosta Xavier<sup>5</sup>, Paulo Cirino de Carvalho Filho<sup>6</sup>**

1. Bolsista CNPQ, Graduanda em Odontologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: edna-vitorio@hotmail.com

2. Orientadora, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: soraya@uefs.br

3. Coordenador do Núcleo de Pesquisa, Prática Integrada e Investigação Multidisciplinar (NUPPIIM), Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isuzart@gmail.com

4. Doutorando em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: laertebarreto@uol.com.br

5. Professora do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: tostamarcia@gmail.com

6. Professor do curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e-mail: pauloccf@yahoo.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Periodontite crônica, BAK, Apoptose, *Porphyromonasgingivalis*

**Introdução.** A periodontite é uma inflamação crônica, de etiologia multifatorial, multibacteriana, com a presença de patógenos-chaves no biofilme subgengival, como *Porphyromonasgingivalis* (Farias,2012). A destruição tecidual está associada à resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro contra um biofilme disbiótico (Hajishengallis, 2014). No tecido conjuntivo gengival doente, há um intenso infiltrado inflamatório e imune, constituído predominantemente por plasmócitos, macrófagos, linfócitos T e B (Freitas ,2012). Além disso, é possível detectar níveis elevados de proteínas pró-inflamatórias, tais como prostaglandina E2, fator de necrose tumoral alfa (do inglês, TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ) e IL-6(MESA,2016).Componentes de *Porphyromonasgingivalis* modulam a resposta imune do hospedeiro por meio de indução de apoptose de linfócitos T e macrófagos. Dentre os determinantes antigênicos indutores de apoptose desta bactéria, destaca-se o HmuY, uma proteína de membrana com a função de captar ferro no microambiente para a nutrição bacteriana (Olczak et al., 2010;Trindade et al., 2012). No processo de morte celular programada, a proteína HmuY induz altos níveis de Bcl-2, resultando na apoptose tardia em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), necrose celular e liberação de seu conteúdo, prolongando o processo de destruição tecidual (Trindade et al., 2012; Carvalho-Filho et al., 2013).A via intrínseca começa com a indução de proteínas que apresentam apenas o domínio BH3 ou com ativação pós-translacional, o que resulta na inativação de alguns membros da família Bcl-2, promovendo a ativação de Bax e Bak, que por sua vez, promove a apoptose (Youlerj; Strasser, 2008).Diante deste panorama, o presente trabalho buscou investigar a expressão gênica de BAK-1 em CMSP de indivíduos e avaliar sua relação com a periodontite crônica.

**Método.**Foi proposto um estudo experimental com pessoas com idades acima de 18 anos e de ambos os sexos, que buscaram voluntariamente os ambulatórios do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana.

O sangue dos indivíduos foi coletado num volume de 20mL, por punção venosa na fossa antecubital com tubo à vácuo estéril (BD-SP) com heparina e submetido a centrifugação por gradiente de densidade. Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram cultivadas em placas de 24 poços por 48h a 37°, em estufa de CO<sub>2</sub>, sob o estímulo da proteína HmuY de *Porphyromonasgingivalis* ATCC33277. Depois da avaliação da qualidade e quantidade de RNA o próximo passo foi a análise das amostras por meio da técnica de microarray.

Foi realizada uma análise descritiva dos dados relativos a gênero, idade e descritores clínicos visando a caracterização da amostra. Em seguida, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e t bicaudal para a comparação dos dados entre os grupos.

**Resultados e Discussão.** Participaram do presente estudo 16 indivíduos, 8 com periodontite crônica grave (PC) e 8 sem periodontite (SP). A média de idade dos participantes do grupo PC foi de  $43.88 \pm 13,9$  anos, enquanto a média de idade dos participantes do grupo SP foi de  $36.63 \pm 10.8$  anos. Cada grupo foi composto de dois homens e seis mulheres. Não houve diferença estatisticamente significativa na média da idade ( $p=0,22$ ), na proporção de indivíduos do sexo masculino e feminino ( $p=1,00$ ) e na quantidade de dentes presentes na boca ( $p=0,98$ ) entre os dois grupos, demonstrando que ambos foram homogêneos no que diz respeito a estascovariáveis (Tabela 1). Em contrapartida, como esperado, houve diferença nos descritores clínicos periodontais, como pode ser observado na tabela 1.

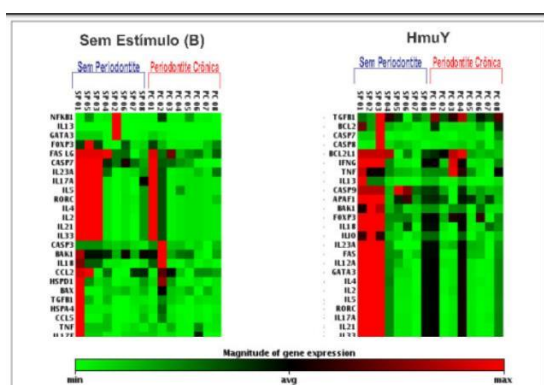
**Tabela 1: Achados clínicos dos grupos sem periodontite (SP) e com periodontite crônica grave (PC).**

	SP	PC	P
Número de homens/mulheres	2/6	2/6	1.000
Idade (anos) (média $\pm$ DP)	$36.63 \pm 10.8$	$43.88 \pm 13,9$	0.223
Número de dentes presentes na boca (média $\pm$ DP)	$20.13 \pm 6.2$	$20.31 \pm 6.5$	0.983
% SS (média $\pm$ DP)	$8.78 \pm 11.49$	$46.23 \pm 14.43$	0.001
% PS $\geq 4$ (média $\pm$ DP)	$1.01 \pm 1.55$	$16.33 \pm 11.44$	0.000
% NIC $\geq 3$ (média $\pm$ DP)	$20.40 \pm 14.03$	$61.87 \pm 17.34$	0.001
% NIC $\geq 5$ (média $\pm$ DP)	$0.45 \pm 1.27$	$23.26 \pm 16.72$	0.000

DP Desvio Padrão, SS Sangramento a Sondagem, PS Profundidade de Sondagem, NIC Nível de Inserção Clínica.

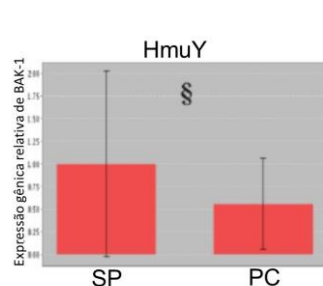
#### PADRÃO DE EXPRESSÃO DE mRNA - “HEAT MAP”

Foram identificadas diferenças no padrão de expressão gênica global entre as amostras de PC e SP, especialmente nas amostras de CMSP nos grupos PC e SP estimulados com rHmuY (Figura 1).

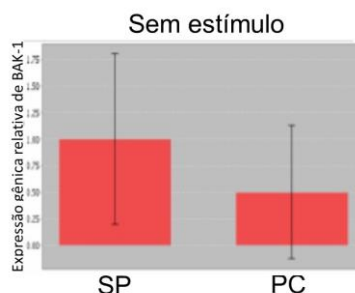


**Figura 1:** - Perfil de Expressão de mRNA - “Heat Map”. Identificação de clusters gênicos envolvidos em mecanismos de apoptose, proteínas de choque térmico, citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição por CMSP de pacientes com periodontite crônica (PC) e sem (SP) sob estímulo de rHmuY de *Porphyromonas gingivalis* e na ausência de estímulos. O gradiente de cor verde-preto-vermelho representa níveis relativos de expressão gênica, indicando “UnderEven-Over” regulação, respectivamente. Em destaque, a expressão gênica de IL-1 $\beta$  nas células dos indivíduos de ambos os grupos, com e sem estímulo.

Quando as células foram cultivadas com a proteína recombinante HmuY, o grupo de participantes com periodontite crônica apresentou níveis de expressão relativa de mRNA de BAK-1 menores do que os níveis de expressão gênica dos participantes sem a doença, com uma tendência à significância estatística ( $0.05 < p < 0.1$ ), como observado na figura 2.



**Figura 2:** Expressão relativa de mRNA correspondente ao gene da proteína da via intrínseca de apoptose BAK-1 em células estimuladas com rHmuY por 48h. SP: sem periodontite; PC: periodontite crônica;  $0.05 < p < 0.1$ . Os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 3:** Expressão relativa de mRNA correspondente ao gene da proteína da via intrínseca de apoptose BAK-1 em células por 48h sem estímulo. SP: sem periodontite; PC: periodontite crônica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na expressão gênica de BAK1 por células não estimuladas (Figura 3).

Os resultados encontrados sugerem que HmuY tem o papel de impedir a ativação da cadeia sinalizadora desta via à nível transcricional em indivíduos com periodontite crônica.

Estímulos apoptóticos intrínsecos, tais como danos ao DNA ou estímulos estressores ao retículo endoplasmático, podem ativar proteínas BH3 que levam à ativação de BAX e BAK e por consequência, à permeabilização da membrana mitocondrial externa. Em seguida, ocorre a liberação de várias proteínas do espaço intermembranar mitocondrial, promovendo a ativação de caspases e apoptose. (Stephen, 2010). Poucos trabalhos na literatura atual demonstram a participação da via intrínseca da apoptose na periodontite. A maioria dos estudos sobre esta via na doença periodontal incluem moléculas anti-apoptóticas, como BCL-2, BCL-X e BCL-6 (Wang, 2015; Lakschevitz, 2013; Carvalho-filho et al., 2013; Semlali, 2011; Tonetti, 1998). Yoshimoto et al., (2015) demonstraram um aumento nos níveis de proteínas pró-apoptóticas BAX, BAK, BIM, e BAD em células epiteliais humanas OBA9 estimuladas com TGF- $\beta$ 1, e o tratamento de TGF- $\beta$ 1 também diminuiu os níveis de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e BCL-XL de maneira tempo-dependente, indicando que a apoptose induzida por TGF- $\beta$ 1 envolveu a via intrínseca mitocondrial. Entretanto, o estudo de BOISVERT et al., (2010) mostrou a manipulação de funções mitocondriais por *Porphyromonas gingivalis* e por seu peptídeo de adesão A44 em células epiteliais durante as primeiras horas de infecção, dificultando o “clearance” pelas células do hospedeiro para remover as células infectadas em processo de apoptose, sugerindo que este mecanismo pode permitir que as bactérias persistam protegidas no ambiente celular até ao passo seguinte na patogênese, progressão ou resolução da infecção. A literatura ainda é incipiente no estudo da expressão de genes relacionados com os mecanismos inflamatórios e apoptose na periodontite crônica, o que faz com que o nosso estudo, tenha uma contribuição importante para a compreensão da interação entre o agente patogênico e o hospedeiro no início e progressão da doença.

**Conclusões:** HmuY de *P. gingivalis* atua na via intrínseca de apoptose das células do hospedeiro por diminuir a expressão gênica relativa para BAK1.

## Referências Bibliográficas

FARIAS BC, SOUZA PRE, FERREIRA B, MELO RSA, MACHADO FB, GUSMÃO ES, CIMÕES R. 2012. Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis; *Braz J Microbiol*; 16: 909.

HAJISHENGALLIS, G; 2014.Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*;35: 3–11.

FREITAS CO,GOMES-FILHO IS, NAVES RC,NOGUEIRA Filho GR,CRUZ SS,SANTOS CA *et al.*; 2012;Influence of periodontal therapy on C-reactive protein level: a systematic review and meta-analysis.*JAppl Oral Sci*; 20:1-8.

MESA F, POZO E, O'VALLE F, PUERTAS A, MAGAN-FERNANDEZ A, ROSEL A *et al.*; 2016; Relationship between periodontal parameters and plasma cytokine profiles in pregnant woman with preterm birth or low birth weight. *Clin Oral Investig*;20:669–674

TRINDADE, S.C., OLCZAK T, GOMES-FILHO I.S.; COSTA, L.F., CERQUEIRA E.M.M., GALDINO-NETO, M. *et al.* ,2012.Induction of interleukin IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodont.*;47:27-32.

EKE, Paul I., *et al.* "Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis." *Journal of periodontology* 83.12 (2012): 1449-1454.

GOMES-FILHO, Isaac S., *et al.* "Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight." *Journal of clinical periodontology* 34.11 (2007): 957-963.

STEFAN A. HIENZ, Sweta Paliwal, and Saso Ivanovski. 2015;Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis *Journal of Immunology Research* Volume , Article ID 615486, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/615486> (acesso em 24/09/2016).

BOISVERT H, DUNCAN, M. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptid A44 to host mitochondria prevents apoptosis. *Infect Immun* 2010; 78:3616-3624.

CARVALHO-FILHO PC, TRINDADE SC, OLCZAK T, *et al.*; *Porphyromonas gingivalis* HmuY stimulates expression of Bcl-2 and Fas by human CD3+ T cells. *BMC Microbiol* 2013; 13:206.

LAKSCHEVITZ, F.S.; ABOODI, G.M.; GLOGAUER, M. Oral neutrophil transcriptome changes result in a pro-survival phenotype in periodontal diseases. *PLoS One*. v.8, p.e68983, 2013.

STEPHEN, W.G.; GREEN, T.D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v.11, p.621-632, 2010.

SHYU, K.G.; CHOY, C.S.; WANG, D.C.; HUANG, W.C.; CHEN, S.Y.; CHEN, C.H.; LIN, C.T.; CHANG, C.C.; HUANG, Y.K. Change of scaling-induced proinflammatory cytokine on the clinical efficacy of periodontitis treatment. *Scientific World Journal*. 289647, 2015.

SEMLALI A, CHAKIR J, GOULET JP, CHMIELEWSKI W, ROUABHIA M. Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *J Periodontal Res* 2011; 46:533-541.

TONETTI, M.S.; CORTELLINI, D.; LANG, N.P. In situ detection of apoptosis at sites of chronic bacterially induced inflammation in human gingiva. *Infection and Immunity*. v.66, p.5190-5195, 1998.

YOSHIMOTO, T.; FUJITA, T.; KAJIYA, M.; MATSUDA, S.; OUHARA, K.; SHIBA, H.; KURIHARA, H. Involvement of smad2 and Erk/Akt cascade in TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. *Cytokine*. v.75, p.165-173, 2015.